

# ХИМИЯ

УДК 547.9:661.15:631.81

И.С. Черепанов

## СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ РОСТРЕГУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ N-КАРБОКСИФЕНИЛ-L-РАМНОЗИЛАМИНОВ

*Ключевые слова:* L-рамноза, аминокислоты, синтез, регуляторы роста, ячмень, пшеница.

*N*-гликозилирование аминов является одним из наиболее эффективных направлений синтеза биологически активных веществ углеводной природы. Модифицирование ариламинов углеводами позволяет повысить их растворимость и снизить токсичность при сохранении высокого уровня биоактивности продуктов. Нами синтезированы, выделены и на основании данных элементного анализа и ИК-Фурье спектроскопии идентифицированы *N*-карбоксифенил-L-рамнозилламины (L-рамнозиламинобензойные кислоты), потенциально биологически активные в качестве рострегулирующих препаратов. *N*-м-карбоксифенил-L-рамнопиранозиламин (выход 85 %) и *N*-п-карбоксифенил-L-рамнопиранозиламин (выход 88 %) выделены в виде водорастворимых твердых продуктов, при этом конформация пиранозного кольца при *N*-гликозилировании сохраняется, а продукты представляют собой смесь β и α-аномеров. Достаточно высокие выходы обоих *N*-гликозидов, вероятно, обусловлены строением L-рамнозы, в частности отсутствием лабильной в отношении процессов меланоидинообразования C<sub>6</sub>-ОН группы. Оценка рострегулирующей способности 0,1%, 0,01% и 0,001% водных растворов синтезированных продуктов, проведенная на проростках ячменя показала слабый ингибирующий эффект для всех растворов *N*-п-карбоксифенил-L-рамнопиранозиламина, тогда как испытания на проростках пшеницы 0,01 и 0,001% растворы показывают ростстимулирующее действие, увеличивающееся с уменьшением концентрации растворов. Для растворов *N*-м-карбоксифенил-L-рамнопиранозиламина как в отношении пшеницы, так и в отношении ячменя наблюдается ингибирующий эффект, усиливающийся с ростом концентрации продукта. Предполагается, что отличия в характере действия рамнозилламинов на тест-растения связаны с их различной склонностью к гидролизу до ариламинов в клетках. Результаты настоящих исследований представляют интерес для разработки экологически чистых регуляторов на основе углеводов и их производных.

I. S. Cherepanov

## SYNTHESIS AND STUDY OF PLANT GROWTH ACTIVITY SYNTHESIS AND STUDY OF PLANT GROWTH ACTIVITY OF N-CARBOXYPHENYL-L-RHAMNOSYLAMINES

*Keywords:* L-rhamnose, aminobenzoic acids, synthesis, plant growth regulators, barley, wheat.

*N*-glycosylation of amines is one of the most effective directions of biologically active substances synthesis of carbohydrate nature. Modification of arylamines by carbohydrates makes it possible to increase their solubility and reduce toxicity while maintaining high level of modified product's bioactivity. We have synthesized, isolated and identified on the basis of ultimate analysis and FTIR spectroscopy data two *N*-carboxyphenyl-L-rhamnosylamines (L-rhamnosylaminobenzoic acids), potentially biologically active as plant growth regulating preparations. *N*-m-carboxyphenyl-L-rhamnopyranosylamine (yield 85%) and *N*-p-carboxyphenyl-L-rhamnopyranosylamine (yield 88%) are isolated as water-soluble solid products, wherein the conformation of the pyranose ring at *N*-glycosylation is maintained and the products are a mixture of β and α-anomers. The sufficiently high yields of the both *N*-glycosides are due to the L-rhamnose structural features, in particular the absence of C<sub>6</sub>-OH group, which labile for melanoidin formation processes. An evaluation of the growth regulating capacity of 0,1%, 0,01% and 0,001% aqueous solutions of synthesized products performed on barley seeds showed weak inhibiting effect for all solutions of *N*-p-carboxyphenyl-L-rhamnopyranosylamine, whereas for wheat seeds stimulating effect, increasing with solution concentration decreasing, was observed for 0,01 and 0,001% solutions. For *N*-m-carboxyphenyl-L-rhamnopyranosylamine's solutions with respect to both, wheat and barley, an inhibitory effect is observed, increasing with concentration increasing. It is suggested, that the differences in the effect of rhamnosylamines on test plants are believed to be related to their different tendency to hydrolysis forming aryl amines in plant cells. The present results obtained are of interest for developing of environmentally regulators based on carbohydrates and their derivatives.

### Введение

*N*-гликозилирование аминов является одним из наиболее эффективных направлений синтеза биологически активных веществ углеводной природы [1,2], *N*-гликозилламины являются фрагментами ряда гликопротеинов, обладают антибактериальной, антиоксидантной, фунгицидной активностью, *N*-арилгликозилламины изучены также как ингибиторы

трегалазы [3]. Данные компьютерного моделирования [4] показывают значительный вклад ариламинофрагментов в гербицидную активность.

В качестве *N*-компонентов гликозилирования в синтезе доступных биопрепаратов перспективны аминокислоты (АБК), известные как доступные биологически активные соединения

[5,6]. При этом недостатками свободных АБК являются недостаточная водорастворимость, воздухо- и светочувствительность.

Модифицирование ариламинов углеводами позволяет повысить их растворимость и снизить токсичность при сохранении высокого уровня биоактивности продуктов [1,7]. В частности, установлено участие N-гликозида *n*-аминобензойной кислоты в качестве интермедиата биохимических процессов растений [8].

Недавно было показано [2], что ряд N-арил-*L*-рамнозиламинов могут быть легко получены с достаточно высокими в сравнении другими N-гликозидами выходами, при этом детальный анализ процессов синтеза авторами [2] не проводился. Следует отметить, что *L*-рамноза является наиболее устойчивой из простых углеводов по отношению к побочным процессам реакций N-гликозилирования [9], при этом N-арилгликозиламины достаточно химически стабильны [10]. В связи с этим в настоящей работе нами синтезированы и изучены в качестве рострегулирующих препаратов N-рамнозиламины *m*- и *n*-аминобензойных кислот.

### Экспериментальная часть

Для синтеза целевых продуктов смесь эквимольных (0,002 моль) количеств *L*-рамнозы («Fluka») и *m*- и *n*-аминобензойных кислот (*m*-АБК, *n*-АБК, «ч.д.а.») растворяли в 15 мл этанола (96% EtOH, «Merck»). Реакционную систему термостатировали в колбах с обратным холодильником в бане с водяным нагревом при 70-75°C в течение 30 минут до полного растворения реагентов [6]. В системе с *n*-АБК требовалось добавление 0,1 мл ледяной уксусной кислоты в качестве катализатора вследствие более низкой основности амина ( $pK_b^{n-АБК} = 11,6$ ;  $pK_b^{m-АБК} = 10,7$  [10]). Контроль за ходом процессов осуществляли методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Silufol» («Sigma Aldrich») в элюентной системе *n*-бутанол : этанол : вода (4:1:5) по наличию/отсутствию пятен аминокислот ( $R_f = 0,82$  и  $0,86$ ) с проявлением в иодной камере. По окончании измерений к раствору добавляли равный объем диэтилового эфира и оставляли реакционную смесь при температуре 18°C для кристаллизации, после чего промывали абсолютным эфиром, высушивали и снимали ИК-Фурье спектры твердых продуктов. Спектры регистрировали в режиме поглощения в таблетках KBr (1:200) на ИК-Фурье спектрометре ФСМ 2201 (ООО «Инфраспек», СПб, Россия) в интервале волновых чисел 4000-500  $cm^{-1}$  со спектральным разрешением по волновому числу 2  $cm^{-1}$  при 60 сканах с предварительной регистрацией опорных спектров. Обработку спектров проводили в среде программы FSPEC 4.2.0.9. Температуры плавления определяли в открытых капиллярах в установках Кьельдала, элементный анализ проводили на анализаторе «Vario MICRO Cube» («Elemental Analyzer GmbH», Germany).

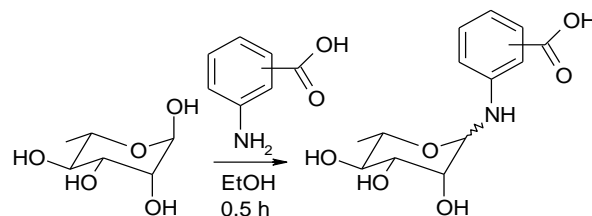
Синтезированные карбоксифенилрамнозиламины (КФРА) представляют собой растворимые в воде порошки белого (*n*-КФРА) и серого (*m*-КФРА) цвета. Выход *n*-КФРА 88%, т. пл. 159-160°C; выход *m*-КФРА

85%, т. пл. 112-113°C соответственно. Элементный анализ: *m*-КФРА (Найдено, %: C 55,25; H 6,25; N 4,91); *n*-КФРА (Найдено, %: C 55,22; H 6,20; N 4,90);  $C_{13}H_{17}O_6N$  (Вычислено %: C 55,12; H 6,00; N 4,91).

Рострегулирующую активность синтезированных соединений определяли в лабораторных условиях на проростках пшеницы (сорт «Московская 35» и ячменя (сорт «Вакула») в качестве тест-растений в трех параллелях. Семена замачивали и выдерживали в течение четырех суток на пропитанной 0,1, 0,01 и 0,001% растворами фильтровальной бумаге порций по 10 семян в чашках Петри при 22°C. По окончании экспериментов определяли длину проростков. Степень ингибирования роста определяли в % по отношению к контролю (дистиллированная вода). Результаты обрабатывали статистически, различия с водным контролем достоверны при  $P=0,95$ .

### Обсуждение результатов

Целевые продукты образуются в соответствии со следующей схемой взаимодействия:



Изучение закономерностей аминокарбонильных взаимодействий в системах углевод – ариламин показало возможность протекания дальнейших процессов деструкции N-гликозиламинов (реакция Майяра), снижающие выход целевых продуктов, обратно пропорциональные основности ариламинов [10]. Достаточно высокие выходы *m*-КФРА и *n*-КФРА связаны, вероятно, с пониженной реакционной способностью *L*-рамнозы в отношении реакций меланоидинообразования [9], обусловленную замещением  $C_6-OH$  группы на водород. На динамике первой стадии реакции Майяра (образовании N-гликозидов) данное структурное изменение практически не сказывается, тогда как при дальнейшем развитии процессов оно оказывает существенный ингибирующий эффект.

Строение выделенных продуктов было изучено методом ИК-Фурье спектроскопии, полученные спектры характеризуются хорошим разрешением сигналов и ровной базовой линией, свидетельствуя о химической стабильности образцов и отсутствии в их составе побочных высокомолекулярных продуктов меланоидинообразования [11]. ИК-Фурье спектр *m*-КФРА (рис.1) показывает вторичной наличие аминогруппы, связанной с ароматическим кольцом ( $1317\text{ см}^{-1}$ ,  $\nu_{C-N}$ ) [12].

Кроме полос поглощения, относимых к ароматическим фрагментам ( $1608$ ,  $1521$ ,  $746\text{ см}^{-1}$ ;  $\nu_{C=C}$ ,  $\gamma_{C-H}$ ) и карбоксильной группе ( $1700\text{ см}^{-1}$ ;  $\nu_{C=O}$ ), фиксируются сигналы, характерные для

N-гликозидов ( $1495, 1005 \text{ см}^{-1}$ ) [1,10,12]. Колебания  $\delta_{\text{N-H}}$ , вероятно, перекрываются ароматическими полосами поглощения и проявляются в виде спутного сигнала при  $1595 \text{ см}^{-1}$ . Несколько максимумов в области  $1010-1090 \text{ см}^{-1}$ , а также две полосы в интервале  $1120-1170 \text{ см}^{-1}$  указывают на пиранозную циклическую форму гликозидного фрагмента [1,10]; интенсивный сигнал при  $968 \text{ см}^{-1}$  относится к маятниковым колебаниям  $\text{CH}_3$ -группы 6-дезоксипроизводных маннопираноз.

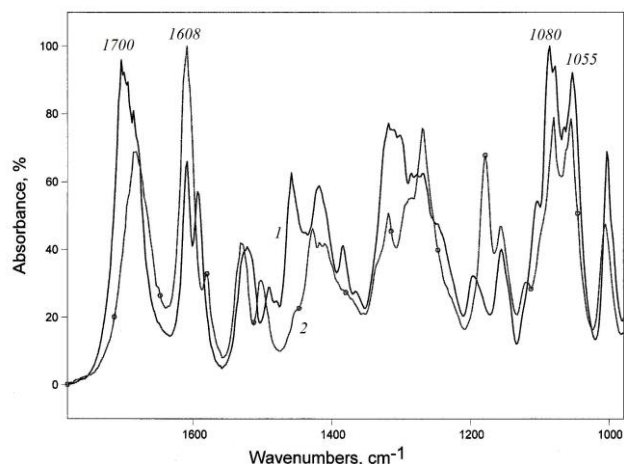


Рис. 1 – ИК-Фурье спектры *м*-КФРА (1) и *п*-КФРА (2) в области  $1000-1750 \text{ см}^{-1}$

Анализ спектра N-*n*-карбоксифенил-*L*-рамнопиранозиламина также подтверждает его структурно-групповой состав наличием аналогичных *м*-КФРА соответствующих полос ( $1681, 1608, 1529, 1502, 1004, 835 \text{ см}^{-1}$ ).  $^1\text{C}_4$ -пиранозная форма углеводного кольца также подтверждается наличием полос  $1055, 1080 \text{ см}^{-1}$  и  $1121, 1162 \text{ см}^{-1}$  [9,13].

Положение полос в «аномерной» области (Рис. 2) дает информацию о характере конформации углеводных фрагментов рамнозиламинов и конфигурации аномерных центров [1,10].

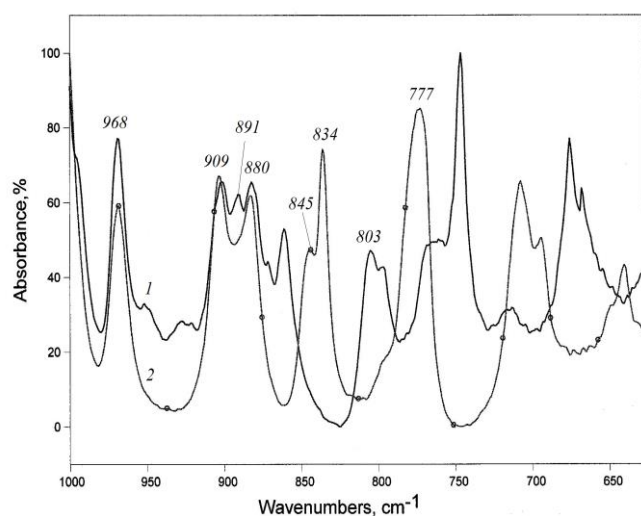


Рис. 2 – ИК-Фурье спектры *м*-КФРА (1) и *п*-КФРА (2) в «аномерной» области

Наличие характерных сигналов в частотном диапазоне  $700-920 \text{ см}^{-1}$  в спектрах обоих продуктов свидетельствует о присутствии в их составе как  $\beta$ , так и  $\alpha$  аномерных форм [14].

Результаты влияния синтезированных рамнозиламинов на прорастание семян ячменя и пшеницы представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 - Зависимость ростовых показателей семян ячменя от концентрации рамнозиламинов

Вариант	<i>м</i> -КФРА		<i>п</i> -КФРА	
	А*	Б**	А*	Б**
контроль	23,7	-	23,7	-
0,1%	8,8	37,1	19,7	83,1
0,01%	15,2	64,2	20,5	86,5
0,001%	17,1	72,2	19,1	80,6
НСР <sub>05</sub>	1,8		2,0	

А\* – средняя длина проростка, мм; Б\*\* – изменение длины проростка в сравнении с контролем, %

Данные таблицы 1 показывают слабый почти независимый от концентрации ингибирующий эффект для всех растворов *п*-КФРА. Для растворов *м*-КФРА наблюдается ингибирующий эффект, усиливающийся с ростом концентрации продукта.

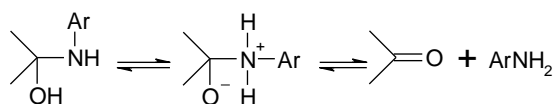
Испытания на проростках пшеницы также показывают выраженный ингибирующий эффект для растворов *м*-КФРА, при этом 0,01 и 0,001% растворы *п*-КФРА проявляют ростстимулирующий эффект, усиливающийся с уменьшением концентрации раствора.

Таблица 2 - Зависимость ростовых показателей пшеницы от концентрации рамнозиламинов

Вариант	<i>м</i> -КФРА		<i>п</i> -КФРА	
	А*	Б**	А*	Б**
контроль	120,8	-	120,8	-
0,1%	75,0	62,1	106,0	88,7
0,01%	80,2	66,4	129,5	107,2
0,001%	88,5	73,3	166,0	137,4
НСР <sub>05</sub>	2,2		2,3	

А\* – средняя длина проростка, мм; Б\*\* – изменение длины проростка в сравнении с контролем, %

Различия в характере активности рамнозиламинов связаны, вероятно, с природой аглика: *п*-АБК проявляет свойства стимулятора [5], тогда как *м*-АБК является ингибитором роста [6]. В клетках растений происходит гидролиз КРФА до соответствующих АБК, протекающий с различной скоростью в зависимости от состава среды и основности амина [15], что обуславливает различное действие *п*-КФРА. В последнем случае влияние связано с необходимостью кислотной диссоциации ОН-группы при  $\text{C}_1$  аминокислоты для формирования карбонильной группы в переходном состоянии стадии гидролиза:



С возрастом основности амина и, соответственно, степени протонирования азота, усиливается кислотная  $\text{C}_1\text{-OH}$  диссоциация и степень гидролитического расщепления.

### Заключение

Таким образом, экспериментальным путем установлена рострегулирующая активность синтетических регуляторов роста класса N-гликозиламинов на растениях пшеницы и ячменя по длине проростков. *m*-карбоксифенил-*L*-рамнозиламин показывает устойчивое ингибирующее действие, тогда как *n*-карбоксифенил-*L*-рамнозиламин стимулирует прорастание пшеницы, ингибируя рост семян ячменя, что, вероятно, связано с различной склонностью КРФА к гидролизу в клетках растений.

### Литература

1. O.A. Nurkenov, I.V. Kulakov, R.A. Ermukhanbetova, *Chemistry for Sustainable Development*, **22**, 151–154 (2014).
2. C. Lingome, G. Pourceau, V. Gobert-Deveaux, *RSC Adv*, **4**, 36350–36365 (2014).

3. W. Du, Y. Hu, *Synth. Commun.*, **34**, 2987–2992 (2004).
4. А.С. Кирлан, Е.А. Кантор, А.С. Димогло, М.К. Вовденко, *Баш. Хим. Ж.*, **18**, 2, 30–34 (2011).
5. L.L. Kirillova, G.N. Nazarova, E.P. Ivanova, *Agricultural Biology*, **51**, 4, 688–695 (2016).
6. M. Palafox, M. Gil, J. Nunez, *Spectroscopy Lett.*, **29**, 4, 609–629 (1996).
7. M.T.I. Chowdhury, M. Naito, R.C. Yanagita, Y. Kawanami, *Plant Growth Regul.*, **75**, 707–713 (2015).
8. E.P. Quinlivan, S. Roje, G. Basset, Y. Shachar-Hill, J. Gregory, A. Hanson, *J. Biol. Chem.*, **278**, 23, 20731–20737 (2003).
9. Y. Pomeranz, J. Johnson, J. Shellenberger, *J. Food Sci.*, **27**, 4, 350–354 (1962).
10. R.I. Kublashvili, *Chem. Nat. Comp.*, **39**, 586–588 (2003).
11. И.С. Черепанов, Г.М. Абдуллина, В.И. Корнев, *Бутлеровские сообщения*, **46**, 4, 71–76 (2016).
12. N.V. Roik, L.A. Belyakova, *Phys. Chem. Solid State*, **12**, 1, 168–173 (2011).
13. M. Kacurakova, P. Capes, V. Savinkova, N. Wellner, A. Ebringerova, *Carbohydr. Polym.*, **43**, 195–203 (2000).
14. S. Tipson, S. Isbell, *J. Res. Nat. Bur. Stand.*, **66A**, 1, 31–58 (1962).
15. А.И. Сливкин, Ю.П. Афиногенов, И.В. Аристов, *Вестник ТГУ*, **4**, 2, 268–269 (1999).

© И. С. Черепанов – к.х.н., доц. каф. Фундаментальной и прикладной химии Удмуртского государственного университета, cherchem@mail.ru

© I. S. Cherepanov - Candidate of Chemistry, associate professor of Fundamental and Applied Chemistry Department, Udmurt State University.

